

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004 年 5 月 27 日 (27.05.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/043160 A1

(51) 国際特許分類: A23J 3/16

[JP/JP]; 〒598-8540 大阪府 泉佐野市 住吉町 1 番地 不二製油株式会社 阪南事業所内 Osaka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/013585

(22) 国際出願日: 2003 年 10 月 23 日 (23.10.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願 2002-328243  
2002 年 11 月 12 日 (12.11.2002) JP

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 不二製油株式会社 (FUJI OIL COMPANY, LIMITED) [JP/JP]; 〒542-0086 大阪府 大阪市 中央区西心斎橋 2 丁目 1 番 5 号 Osaka (JP).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

(72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 石川 正広 (ISHIKAWA, Masahiro) [JP/JP]; 〒598-8540 大阪府 泉佐野市 住吉町 1 番地 不二製油株式会社 阪南事業所内 Osaka (JP). 廣塚 元彦 (HIROTSUKA, Motohiko)

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: FRACTIONATED SOYBEAN PROTEIN AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME

(54) 発明の名称: 分画された大豆蛋白及びその製造法

(57) Abstract: It is aimed at developing a novel method of fractionating 7S globulin and 11S globulin, in particular, a highly accurate and efficient fractionation method which can be performed on an industrial scale. It is also intended to obtain a protein fraction which is little contaminated with lipid-associated proteins and exhibits the characteristics inherent to highly pure 7S globulin and 11S globulin. A process for producing soybean protein characterized by comprising heating a solution containing soybean protein to 30 to 75°C under acidic conditions of pH 3.8 to 6.8 and then fractionating it into a soluble fraction and an insoluble fraction at an ionic strength of 0.02 or more and a pH value of 4.5 or higher but lower than 5.6.

(57) 要約: 7S グロブリンと 11S グロブリンの新規な分画法、特に工業的規模で行え、高精度で効率のよい分画法を目的とする。また、脂質会合蛋白質の混入率が少なく、純度の高い 7S グロブリンと 11S グロブリンの特徴ある性質を有する蛋白画分を得ることにある。大豆蛋白を含む溶液を、pH3.8~6.8 の酸性下で 30~75°C の加温処理の後、イオン強度 0.02 以上、pH4.5 以上 5.6 未満で可溶性画分と不溶性画分に分画することを特徴とする大豆蛋白の製造法。

## 明細書

### 分画された大豆蛋白及びその製造法

## 技術分野

本発明は、大豆蛋白を含む溶液から 7S グロブリンに富んだ画分と 11S グロブリンに富んだ画分を製造する方法、およびその方法により得られる大豆蛋白に関する。

## 背景技術

大豆の貯蔵蛋白は、pH4.5 付近でし、比較的簡単に蛋白以外の成分と分けることができる。この貯蔵蛋白は、大豆分離蛋白といわれ、食品工業における利用は多くこの形でなされる。蛋白はまた超遠心分析による沈降定数から、2S、7S、11S 及び 15S の各グロブリンに分類される。このうち、7S グロブリンと 11S グロブリンはグロブリン画分の主要な構成蛋白成分（注：7S グロブリン、11S グロブリンは沈降法による分類名であり、免疫学的命名法にいう  $\beta$ -コングリシニン、グリシニンに実質的に相当する。）であり、この両者は粘性・凝固性・界面活性等において異なる性質を有する。したがって、大豆蛋白質を 7S グロブリンに富んだ区分と 11S グロブリンに富んだ区分に分画することができれば両蛋白の性質を利用することが可能となり、産業における蛋白利用分野の拡大が期待できる。

7S グロブリン、11S グロブリンは幾つかのサブユニットからなり、7S グロブリンは  $\alpha$ 、 $\alpha'$ 、 $\beta$  の 3 種類のサブユニット、11S グロブリンは酸性ポリペプチド(A)と塩基性ポリペプチド(B)を一对とした数種のサブユニットからなっている。従来のも最も通常の大豆において、その存在比率は、典型的には SDS-ポリア

クリルアミドゲル電気泳動で得られたパターンのデンストメトリーによる面積比で 7S グロブリン : 11S グロブリンが略 1 : 2 である。7S グロブリンと 11S グロブリンの性質は、分子量も荷電の状態もよく似ている。特に、両グロブリンはサブユニットの組み合わせにより多様性を持つ蛋白で、これらの性質はある程度幅があり、相互にオーバーラップしている。したがって、両者の相互の混入が少ない有効な分離をするのは、容易でない。

従来から知られている分画法を以下に示す。すなわち、等電点の違いを利用するもの : 11S グロブリンの等電点近傍で 7S グロブリンのみを抽出させる方法 (特開昭 55-124457 号公報)。カルシウムとの反応性の違いを利用するもの : 抽出時に少量のカルシウム塩を添加して 7S グロブリンに富む画分を抽出させる方法 (特開昭 48-56843 号公報)。pH・イオン強度での溶解性の違いを利用する方法 : pH1.2 ~ 4.0 の塩化ナトリウムまたは塩化カリウム存在下で不溶性区分を除去して 7S グロブリンを製造する方法 (特開昭 49-31843 号公報)、等電点したスラリーを pH5.0 ~ 5.6 に調整し、かつ塩化ナトリウム濃度を 0.01~0.2M のモル濃度に調整して、7S グロブリンと 11S グロブリンを分離する方法 (特開昭 58-36345 号公報)、蛋白含有溶液のイオン強度を 0.2~0.3 に調整し、かつ pH 値を 4.8~5.2 に調整して不溶性画分を除いた後、イオン強度を 0.2 未満および pH 値を 4.6~5.0 に調整して 7S グロブリンを分取する方法 (特開平 5-43597 号公報)。冷沈現象と還元剤等を利用するもの : 11S グロブリンが低温下では溶解性が低下する現象 (冷沈現象とよぶ) を利用したもので、大豆蛋白原料を亜硫酸化合物、グルタチオン化合物、またはシステイン化合物の存在下、かつ pH6.5 以上の水系下処理し、pH5.5 ~ 7.0 かつ 22℃以下の範囲に調整して 7S グロブリンに富んだ可溶性画分と 11S グロブリンに富んだ不溶性画分に分画する方法 (特開昭 61-187755 号公報)。

これら従来から知られている分画方法は、7S グロブリンと 11S グロブリンの pH、イオン強度、ある種の塩の存在、温度等による溶解性の違いをたくみに利用した技術であるが、明確な分画を行う為には高い遠心力による分離を必要とするなど、工業的な分画法としては不適當であるという問題点があり、実用面で問題を残していた。例えば、特開昭 61-187755 号公報の方法では、冷沈現象は温度に強く依存するため 5℃程度まで冷却する必要がある、工業的な低い遠心力で分離するには大量の亜硫酸化合物などの添加を要するという実用面での問題と、可溶性画分への 11S グロブリンの混入が少なからずあるという分画精度面での問題を残していた。

7S グロブリンに富む蛋白を得るということでは、育種による 11S グロブリン欠損大豆、すなわち 7S グロブリンに富んだ種子 (Breeding Science ,46, 11,1996) から蛋白を分離することが検討され、それを応用した報告 (Breeding Science ,50, 101,2000) や特許 (US 6,171,640 B1) も出されている。

以上のように、可溶性および不溶性画分への相互の混入率が少なく、かつ簡便に効率よく工業規模での製造が行える 7S グロブリンに富んだ画分と 11S グロブリンに富んだ画分の分画法の開発研究が行われている。

一方、大豆由来の蛋白には、細胞膜をはじめとするプロテインボディー、オイルボディー等の膜を構成する極性脂質との親和力の高い蛋白質 (脂質会合蛋白質) が存在し、工業的に生産する分離大豆蛋白の約 35%をも占めていることが佐本らにより報告されている (Biosci.Biotechnol.Biochem., 62 (5), 935-940 (1998))。この脂質会合蛋白質は膜蛋白質を主体とする蛋白群の総称で、特に SDS-ポリアクリルアミド電気泳動による推定分子量において主に 34kDa、24kDa、18kDa を示す蛋白質を含み、クロロホルム：メタノール=2：1 の極性溶媒により抽出される極性脂質を 10～12 重量%程度含有する。

従来の分画法は 7S グロブリンと 11S グロブリンのみに注目しており、各画分に混在する脂質会合蛋白質については考慮されていない場合が多かった。その理由として、脂質会合蛋白質は SDS-ポリアクリルアミド電気泳動による分析では 7S グロブリンや 11S グロブリンほど明確に特定することができず、その存在を過少に評価する場合が多かった。言い換えれば、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動により測定される純度だけでは、真の純度を過大に評価している場合が多く、真に純度の高い 7S グロブリンや 11S グロブリンを得るには、この脂質会合蛋白質の挙動を考慮する必要がある。つまり、これまでの 7S グロブリン／11S グロブリンの 2 画分への分画では、7S グロブリンと 11S グロブリンの比率によってのみ分画品の純度を議論している場合が多かった。しかし各画分は脂質会合蛋白質を随伴し、実際の蛋白質組成としては脂質会合蛋白質を多く含む精製純度のやや低い粗分画品となっている場合が多かった。

本発明者等は、工業的な 7S グロブリンと 11S グロブリンの分画が可能となる酸性下での加温処理のみの方法（WO 02/28198 A1）を提案したが、さらに鋭意研究した結果、大豆蛋白を含む溶液の酸性下での加温処理と、イオン強度の調整を組み合わせることで、7S グロブリンを含む可溶性画分と 11S グロブリンを含む不溶性画分の分離 pH を低くすることが可能となり、それにより、可溶性画分と不溶性画分の分離が一層容易になることを見出した。

本発明は、7S グロブリンと 11S グロブリンの新規な分画法を提案するものであり、特に工業的規模で行え、高精度で効率のよい分画法を目的とする。また他の目的は、脂質会合蛋白質の混入率が少なく、純度の高い 7S グロブリンと 11S グロブリンの、特徴ある性質を有する蛋白画分を得ることにある。

【特許文献 1】 特開昭 55-124457 号公報

【特許文献 2】 特開昭 48-56843 号公報

- 【特許文献 3】 特開昭 49-31843 号公報
- 【特許文献 4】 特開昭 58-36345 号公報
- 【特許文献 5】 特開平 5-43597 号公報
- 【特許文献 6】 特開昭 61-187755 号公報
- 【特許文献 7】 US 6,171,640 B1
- 【特許文献 8】 WO 02/28198 A1
- 【非特許文献 1】 K Yagasaki etc, Breeding Science, 46, 11, 1996
- 【非特許文献 2】 K Yagasaki etc, Breeding Science, 50, 101, 2000
- 【非特許文献 3】 M Samoto etc, Biosci. Biotechnol. Biochem.,  
62(5), 935-940, 1998

#### 発明の開示

本発明は、

- (1) 大豆蛋白を含む溶液を、酸性下で加温処理の後、イオン強度 0.02 以上、pH4.5 以上 5.6 未満で可溶性画分と不溶性画分に分画することを特徴とする大豆蛋白の製造法。
- (2) 大豆蛋白を含む溶液が脱脂大豆の加水スラリー、同スラリーから得られる脱脂豆乳、酸沈澱大豆蛋白スラリー、または分離大豆蛋白溶液である (1) 記載の製造法。
- (3) 酸性が pH3.8~6.8 である (1) 記載の製造法。
- (4) 加温処理が 30~75℃である (1) 記載の製造法。
- (5) (1) 記載の分画方法によって得られる可溶性画分から 7S グロブリン / (11S グロブリン+7S グロブリン) の比が 0.5 以上であり、固形分中のクロロホルム：メタノール=2：1 溶媒で抽出される極性脂質含量が 1 重量%以下で

ある 7S グロブリン蛋白を分取する (1) 記載の製造法。

(6) 固形分中のフィチン酸含量が 1.2 重量%以下である (5) 記載の方法で得られた 7S グロブリン蛋白。

(7) (1) 記載の分画方法によって得られる不溶性画分から 11S グロブリン / (11S グロブリン + 7S グロブリン) の比が 0.7 以上であり、固形分中のクロロホルム : メタノール = 2 : 1 溶媒で抽出される極性脂質含量が 2 重量%以下である 11S グロブリン蛋白を分取する (1) 記載の製造法。

(8) 固形分中のフィチン酸含量が 1.2 重量%以下である (7) 記載の方法で得られた 11S グロブリン蛋白。

に、関する。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明は、大豆蛋白を含む溶液の酸性下での加温処理と、イオン強度の調整を組み合わせることで、工業的な 7S グロブリンと 11S グロブリンの分画が可能となる酸性下での加温処理のみの方法 (WO 02/28198 A1) と比べて、7S グロブリンを含む可溶性画分と 11S グロブリンを含む不溶性画分の分離 pH を低くすることが可能となり、それにより、可溶性画分と不溶性画分の分離が一層容易になることを特徴とする分画大豆蛋白の製造法である。上記酸性は pH3.8 ~ 6.8 が好ましく、加温する温度は 30~75℃が好ましい。イオン強度は 0.02 以上が好ましく、可溶性画分と不溶性画分の分離は pH4.5 以上 5.6 未満が好ましい。これにより、7S グロブリンに富み脂質会合蛋白質の少ない可溶性画分を得ることができる。またこれにより、11S グロブリンおよび脂質会合蛋白質に富んだ不溶性画分が生成するが、この不溶性画分の 11S グロブリンを略中性 (概ね pH6.5~7.5) の水溶液中で弱い煎断力で溶解、あるいは抽出することにより、脂質会合蛋白質を不溶化させたまま 11S グロブリンを選択的に溶解させ分離す

ることが可能で、11S グロブリンに富み脂質会合蛋白質の少ない画分を得ることができる。

また、本発明は製造工程中、フィターゼによるフィチン酸分解を施すことにより、得られる蛋白当たり 1.2%以下の低フィチンの蛋白画分を得ることができる。さらに、可溶性画分と不溶性画分を分離する前のフィターゼ処理により、分離効率を向上させることができる。

上記製造法によって得られた可溶性画分は、7S グロブリン / (11S グロブリン + 7S グロブリン) の比が 0.5 以上であり、可溶性画分と不溶性画分の分離 pH を適当に選択することによって当該比が 0.8 以上、0.85 以上、或いは 0.9 以上の高純度 7S グロブリン画分を容易に得ることができる。もう一つの画分である不溶性画分は、11S グロブリン / (11S グロブリン + 7S グロブリン) の比が 0.7 以上の画分であり、可溶性画分と不溶性画分の分離 pH を適当に選択することによって当該比が 0.8 以上、0.85 以上、或いは 0.9 以上の高純度 11S グロブリン画分を容易に得ることができる。

ここに、7S グロブリン / (11S グロブリン + 7S グロブリン) や 11S グロブリン / (11S グロブリン + 7S グロブリン) の比は、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動で得られた泳動パターンをデンストメーターで測定し、該当画分の面積の比率から得られる。

また、上記脂質会合蛋白質は、ほとんど変性していない酸沈澱蛋白から硫酸ナトリウムを用いて精密に得ると酸沈澱蛋白中に 30~35%程度存在（前記 Biosci.Biotechnol.Biochem., 62 (5), 935-940 (1998)）する。また、クロロホルム / メタノール = 2 : 1（容量比）で抽出される極性脂質が、該酸沈澱蛋白固形物中には 3~4 重量%存在し、脂質会合蛋白質中には 10~12%存在する事実から、上記極性脂質（以下「クロメタ油分」と略すことがある）は酸沈澱蛋白の中で



も脂質会合蛋白質中に偏在し、クロメタ油分の 10 重量倍が脂質会合蛋白質であると換算できる。ただしこの換算は、脂質会合蛋白質がヘキサンなどによる脱脂の工程を経ている対象に適用でき、ヘキサン抽出の工程を経ていない対象である場合にはヘキサンで予め脱脂した後に適用できる。

本発明により得られる 7S グロブリンに富む可溶性画分は、クロメ油分が 1% 以下であり、換算すると脂質会合蛋白質は 10% 以下となる。また、不溶性画分から抽出した 11S グロブリンに富む画分は、クロメタ油分が 2% 以下であり、換算すると脂質会合蛋白質は 20% 以下の大豆蛋白画分となる。

本発明に用いた分析方法を以下に記載する。

\*粗蛋白質；ケールダール法に基づき窒素含量を求め、係数 6.25 を掛けて粗蛋白質に換算した。

\*不溶性画分の分離沈降速度；L.U.M.社製の分離特性分析装置 LUMiFuge 114 を用い、不溶性画分を含む試料溶液 0.5ml をポリスチレン製角型セルに入れ、100G で遠心分離した時の透過率 20% の界面の移動速度を分離沈降速度とした。

\*SDS・ポリアクリルアミド電気泳動；Laemmli (Nature, 227, 680(1970)) の方法に基づきゲル濃度 10~20% のグラディエントゲルで分析した。蛋白アプライ量は固形分換算で 6  $\mu$ g とし、染色はクーマシーブリリアントブルー R-250 を用いて行った。

\*フィチン酸；Alii Mohamed の方法 (Cereal Chemistry 63, 475-478.1986) に準拠して測定した。

\*クロメタ油分；試料乾物に対してクロロホルム・メタノールの混合液（容量比、2:1）を約 50 倍加え、還流抽出される固形分の重量比をクロメタ油分として測定した。

\*純度（SPE 基準）；上記の SDS・ポリアクリルアミド電気泳動で得られた泳動

パターンをデンスリトメーターで測定し、その全体に対する該当画分の面積比率を純度（SPE 基準）とした。ここに 7S グロブリン含量は $\alpha$ 、 $\alpha'$ 、 $\beta$ サブユニットの総含量を指し、11S グロブリン含量は酸性ポリペプチド(A)と塩基性ポリペプチド(B)の総量を指す。

\*補正純度；上記で得られた純度（SPE 基準）から、混在する脂質会合蛋白質の量も考慮した補正純度を以下のように算出した。すなわち試料の純度（SPE 基準）の値を A%として、当該試料中には 7S グロブリン及び 11S グロブリン以外にクロメタ油分の 10 倍重量に相当する脂質会合蛋白質も存在するので、7S グロブリン及び 11S グロブリンに脂質会合蛋白質の量を含めた合計蛋白に対する純度として算出する。

$$\text{補正純度(\%)} = (100(\%) - \text{クロメタ油分(\%)} * 10) * A(\%) / 100$$

\*イオン強度；導電率計（2 %/℃ 温度換算機能付）を用いて、溶液の導電率を測定し、その導電率に相当する NaCl モル濃度をイオン強度とした。

以下に本発明の好ましい態様を記載する。

本発明に用いる原料大豆は市販の大豆、または育種や遺伝子操作などにより特定の画分が欠損した大豆のいずれも用いることが可能である。大豆蛋白を含む溶液は、脱脂大豆の加水スラリー（以下、脱脂大豆スラリーと呼ぶ。）、同スラリーから得られる脱脂豆乳、酸沈澱大豆蛋白スラリー（以下、カードスラリーと呼ぶ。）、または分離大豆蛋白溶液のいずれでも良いが、特に脱脂大豆の加水スラリーを用いた方が可溶性画分と不溶性画分の分離が容易となるので好ましい。また、7S グロブリンに富んだ画分と 11S グロブリンに富んだ画分に分画するためには、未変性もしくは低変性大豆蛋白溶液が好ましい。

大豆蛋白を含む溶液の酸性下の加温処理は、pH3.8 ～6.8、好ましくは pH4.0 ～6.6、より好ましくは pH 4.2～6.2 の酸性下で 30～75℃、好ましくは 35～65℃、

さらに好ましくは 40～60℃での加温処理が良い。イオン強度は 0.02 以上で可溶性画分と不溶性画分の分離が容易になり、より高くすることで可溶性画分と不溶性画分の分離が一層容易になる。但し、イオン強度 0.2 以上の場合、分離後の可溶性画分から 7S グロブリンを等電点沈澱させる為にはイオン強度を 0.2 未満にする必要があり、操作が煩雑となるので、好ましくは 0.02 以上 0.2 未満が良い。可溶性画分と不溶性画分の分離は、pH4.5 以上 5.6 未満で行うことにより 7S グロブリンに富んだ可溶性画分と 11S グロブリンに富んだ不溶性画分が得られる。また、製造工程中、特に可溶性画分と不溶性画分を分画するまでのいずれかの工程で、大豆蛋白と共存するフィチン酸をフィターゼで分解することにより、7S グロブリンに富んだ画分と 11S グロブリンに富んだ画分の分離が一層容易になる。フィターゼ処理は酸性下での加温処理と同時に行うと簡便である。フィターゼは、起源により多少異なるものの、通常 pH3.5～9.0、温度 20～70℃、5 分間～3 時間、蛋白重量 (g) あたり 0.1～100unit 程度作用させるのが適している。なお 1unit のフィターゼ活性は pH5.5、37℃の下で反応初期の 1 分間に基質のフィチン酸から 1 $\mu$ モルのリン酸を遊離する酵素量を表わす。

上記加温処理のための加温保持時間の長短は、加温処理の pH や温度に比べて分離の難易にあまり大きく影響せずあまり重要ではない。加温処理時の pH が 3.8 ～6.8 の範囲外、または温度が 30℃～75℃の範囲外であると、7S グロブリンと 11S グロブリンの分離が難しくなる。

加温処理後は、微生物管理上冷却する方が好ましいが、そのままの温度で分画に移ってもよい。分画の手段は、公知の分離手段（ろ別、遠心分離等）を用いることができ、特に連続式遠心分離機（例えばデカンター）等を用いても容易に、かつ効率的に分離することができる。むろんバッチ式等の非連続式遠心分離機の使用を妨げるものではない。

本発明による可溶性画分である 7S グロブリンに富んだ画分と不溶性画分である 11S グロブリンに富んだ画分の分画精度は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で得られたパターンで評価できる（純度は SPE 基準）。

しかし、SPE 基準の純度では、脂質会合蛋白質が SDS-ポリアクリルアミド電気泳動での染色性が低いために過少に評価されるので、前記補正純度 (%) =  $(100(\%) - \text{クロメタ油分}(\%) * 10) * A(\%) / 100$  の式を用いた補正純度の値の方が、より真の純度に近い値と考えられる。

分離後の可溶性画分は、そのまま、あるいは濃縮して、あるいは中和して、あるいは殺菌して、あるいは乾燥して、7S グロブリンに富んだ画分として用いることができる。濃縮する手段としては、イオン強度を 0.2 未満に調整し、かつ pH 値を 4.0～5.0 に調整して生じる不溶性画分を分離回収する方法が例示され、その後加水、中和、加熱殺菌処理し、乾燥する形態が最も通常である。加熱殺菌処理は公知の HTST、UHT 処理等で行うことができる。目的に応じて、溶液の状態でプロテアーゼ等を用いた酵素処理をすることももちろん可能である。

分離後の不溶性画分からは、略中性（概ね pH6.5～7.5）の水溶液を用いて 11S グロブリンを溶解、あるいは抽出し、不溶性の脂質会合蛋白質（不溶性画分がおから成分を含む場合はおから成分も含む）と分離することができる。この際、11S グロブリンの溶解、あるいは抽出は可能な限り弱い煎断力で行った方が脂質会合蛋白質画分の可溶化を防ぎ、11S グロブリンを選択的に溶解、あるいは抽出することができるので好ましい。また、溶解、あるいは抽出した 11S グロブリンと脂質会合蛋白質との分離には約 4,000G 以上の、好ましくは約 5,000G 以上の高 G 遠心分離機に掛けるのが好適であり、これにより 11S グロブリン／（11S グロブリン＋7S グロブリン）の比が 0.7 以上を維持したまま、クロメタ油分が固形物中 2%以下の蛋白を得ることができる。

略中性の水溶液を用いて溶解、あるいは抽出したクロメタ油分が 2%以下の 11S グロブリンに富む画分は、このまま、あるいは濃縮して、あるいは中和して、あるいは殺菌して、あるいは乾燥して、11S グロブリンに富んだ画分として用いることができる。濃縮する手段としては、可溶性画分を pH4.5 以上 5.6 未満に調整して生じる不溶性画分を分離回収する方法が例示され、その後加水、中和、加熱殺菌処理し、乾燥する形態が最も通常である。加熱殺菌処理は公知の HTST、UHT 処理等で行うことができる。目的に応じて、溶液の状態でプロテアーゼ等を用いた酵素処理をすることももちろん可能である。

以下、この発明の実施例を示すが、本発明がこれらによってその技術範囲が限定されるものではない。

#### <実施例 1>

大豆を圧扁し、*n*-ヘキサンを抽出溶媒として油を抽出分離除去して得られた低変性脱脂大豆（窒素可溶指数：NSI 91）1 重量部に、10 重量部の抽出水（イオン交換水）を加え、ホモミキサーを用いて 22℃で攪拌、20%水酸化ナトリウム溶液で pH7.2 に維持しながら 40 分間抽出した。次いで、抽出液をろ布でろ過し、さらに 5,000G で 10 分間遠心分離して不溶物を除いた脱脂豆乳を得た。得られた脱脂豆乳の pH を 35%塩酸を用いて pH 4.5 に調整し、3,000G で 10 分間遠心分離して酸沈澱蛋白を得た後、たん白が乾燥重量で 5%となるように酸沈澱蛋白にイオン交換水を加えてポリトロン（KINEMATICA AG 社製）で均質化（以下、カードスラリーと呼ぶ。）した。カードスラリーのイオン強度を塩化ナトリウムを用いて 0.14 に調整し、22℃で 30 分間攪拌、次いで、20%水酸化ナトリウム溶液を用いてカードスラリーの pH を 5.3 に調整し、22℃で 20 分間攪拌した。その後、カードスラリーを 50℃まで昇温し、50℃で 10 分間攪拌した後、

直ちに 22℃まで冷却した。この時、昇温初めから 22℃まで冷却するのに要した時間は 25 分間であった。22℃でさらに 15 分間攪拌した後、LUMiFuge 114 を用いて不溶性画分の分離沈降速度を測定するとともに、5,000G で 5 分間遠心分離して得られた可溶性画分と不溶性画分を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動に供し、7S グロブリンと 11S グロブリンの存在比 (SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法による泳動パターンをデンストメーターで測定した該当画分の面積比) を求めた。

表 1 に不溶性画分の分離沈降速度、表 2 に可溶性画分と不溶性画分の 7S グロブリンと 11S グロブリンの存在比を示す。

#### <比較例 1>

実施例 1 と同様に調製した 5%カードスラリーのイオン強度を、塩化ナトリウムを用いて 0.14 に調整し、22℃で 30 分間攪拌、次いで、20%水酸化ナトリウム溶液を用いてカードスラリーの pH を 5.3 に調整し、22℃で 60 分間攪拌した。その後、実施例 1 と同様の方法で不溶性画分の分離沈降速度を測定するとともに、5,000G で 10 分間遠心分離して得られた可溶性画分と不溶性画分を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動に供し、7S グロブリンと 11S グロブリンの存在比を求めた。

表 1 に不溶性画分の分離沈降速度、表 2 に可溶性画分と不溶性画分の 7S グロブリンと 11S グロブリンの存在比を示す。

#### (表 1) 不溶性画分の分離沈降速度

	加温処理あり	加温処理なし
分離沈降速度 ( $\mu\text{m}/\text{秒}$ )	146	57

(表 2) 7S グロブリンと 11S グロブリンの存在比 (7S:11S)

	可溶性画分	不溶性画分
加温処理あり	98:2	15:85
加温処理なし	98:2	13:87

実施例 1 および比較例 1 の結果より、カードスラリーを酸性下で加温処理することにより、高純度の 7S グロブリンを含む可溶性画分と高純度の 11S グロブリンを含む不溶性画分の分離が一層容易になることが明らかである。

#### <実施例 2>

実施例 1 と同様に調製した 5%カードスラリーのイオン強度を、塩化ナトリウムを用いて 0.14 に調整し、pH 調整をせずに (約 pH4.5) 22℃で 30 分間攪拌した後、50℃まで昇温、その後直ちに 22℃まで冷却した。この時、昇温初めから 22℃まで冷却するのに要した時間は 15 分間であった。冷却後、20%水酸化ナトリウム溶液を用いてカードスラリーの pH を 5.5 に調整して 15 分間攪拌し、実施例 1 と同様の方法で不溶性画分の分離沈降速度を測定するとともに、可溶性画分と不溶性画分の 7S グロブリンと 11S グロブリンの存在比を求めた。

表 3 に可溶性画分と不溶性画分の 7S グロブリンと 11S グロブリンの存在比、表 4 に不溶性画分の分離沈降速度を示す。

#### <比較例 2>

実施例 1 と同様に調製した 5%カードスラリーのイオン強度を調整せずに (イオン強度 0.013)、実施例 2 と同様の加温処理 (pH 未調整、22℃で 30 分間攪拌

した後、50℃まで昇温、その後直ちに 22℃まで冷却)を行った。次いで、20% 水酸化ナトリウム溶液を用いてカードスラリーの pH を 5.9 に調整し (イオン強度が低い場合は、可溶性画分と不溶性画分の分離 pH を高くしなければ 7S グロブリンと 11S グロブリンの存在比が同程度の画分を得ることが出来ない)、15 分間攪拌した後に、実施例 1 と同様の方法で不溶性画分の分離沈降速度を測定するとともに、可溶性画分と不溶性画分の 7S グロブリンと 11S グロブリンの存在比を求めた。

表 3 に可溶性画分と不溶性画分の 7S グロブリンと 11S グロブリンの存在比、表 4 に不溶性画分の分離沈降速度を示す。

(表 3) 7S グロブリンと 11S グロブリンの存在比(7S:11S)

イオン強度	分離 pH	可溶性画分	不溶性画分
0.14	5.5	84:16	18:82
0.013	5.9	82:18	15:85

(表 4) 不溶性画分の分離沈降速度

イオン強度	0.14	0.013
分離沈降速度 (μm/秒)	204	48

実施例 2 および比較例 2 の結果より、イオン強度を高くし、かつ分離 pH を低くすることで、7S グロブリンを含む可溶性画分と 11S グロブリンを含む不溶性



画分の分離が一層容易になることが明らかである。

以上までの実施例および比較例の結果より、大豆蛋白を含む溶液の酸性下の加温処理とイオン強度の調整の組み合わせにより、7S グロブリンを含む可溶性画分と 11S グロブリンを含む不溶性画分の分離が、酸性下の加温処理のみ、あるいはイオン強度の調整のみの場合よりも一層容易になることが明らかである。

#### <実施例 3>

実施例 1 と同様に脱脂した低変性脱脂大豆 1 重量部に、10 重量部の 22℃の抽出水（イオン交換水）を加え（以下、脱脂大豆スラリーと呼ぶ）、塩化ナトリウムを用いてイオン強度が 0.17 となるように調整し、pH 未調整で 22℃、30 分間プロペラ攪拌した。次いで、35%塩酸を用いて pH5.3 に調整し、50℃まで昇温して 10 分間プロペラ攪拌した後、直ちに 22℃まで冷却した。この時、50℃まで昇温するのに 10 分間、22℃まで冷却するのに 5 分間それぞれ要した。冷却後、35%塩酸を用いて pH4.8 に調整し、22℃でさらに 10 分間攪拌した後、実施例 1 と同様に不溶性画分の分離沈降速度を測定するとともに、5,000G で 5 分間遠心分離して得られた可溶性画分については実施例 1 と同様に 7S グロブリンと 11S グロブリンの存在比を求めた。一方、不溶性画分は加水（脱脂大豆の 7 倍重量）し、ホモミキサーを用いて 22℃で攪拌、20%水酸化ナトリウム溶液で pH を 7.2 に維持しながら 30 分間抽出した後、5,000G で 5 分間遠心分離して得られた可溶性画分を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動に供し、7S グロブリンと 11S グロブリンの存在比を求めた。

表 5 に可溶性画分と不溶性画分の 7S グロブリンと 11S グロブリンの存在比、表 6 に不溶性画分の分離沈降速度を示す。

#### <比較例 3>

実施例 3 と同様に調製した脱脂大豆スラリーを、塩化ナトリウムを用いてイ

オン強度が 0.17 となるように調整し、22℃で 30 分間攪拌、次いで、35%塩酸を用いて脱脂大豆スラリーの pH を 5.3 に調整し、22℃で 25 分間攪拌した。その後、20%水酸化ナトリウム溶液を用いて pH4.8 に調整し、22℃で 10 分間攪拌した後、実施例 1 と同様の方法で不溶性画分の分離沈降速度を測定するとともに、可溶性画分と不溶性画分の 7S グロブリンと 11S グロブリンの存在比を求めた。

表 5 に可溶性画分と不溶性画分の 7S グロブリンと 11S グロブリンの存在比、表 6 に不溶性画分の分離沈降速度を示す。

(表 5) 7S グロブリンと 11S グロブリンの存在比(7S:11S)

	可溶性画分	不溶性画分
加温処理あり	92:8	9:91
加温処理なし	91:9	10:90

(表 6) 不溶性画分の分離沈降速度

	加温処理あり	加温処理なし
分離沈降速度 ( $\mu\text{m}/\text{秒}$ )	395	84

実施例 3 および比較例 3 の結果より、脱脂大豆スラリーを用いる場合も、酸性下の加温処理とイオン強度の調整により可溶性画分と不溶性画分の分離が容易になることが明らかである。

## &lt;実施例 4&gt;

実施例 1 と同様に調製した 5%カードスラリーのイオン強度を、塩化ナトリウムを用いて 0.17 に調整し、実施例 3 と同様の加温処理（pH 未調整で 22℃、30 分間プロペラ攪拌。次いで、pH5.3 に調整し、50℃まで昇温して 10 分間プロペラ攪拌した後、直ちに 22℃まで冷却）を行った後、20%水酸化ナトリウム溶液を用いて pH5.4 に調整し（イオン強度の同じ脱脂大豆スラリーとカードスラリーの場合、7S グロブリンと 11S グロブリンの存在比が同程度の画分を得る為にはカードスラリーの分離 pH を脱脂大豆スラリーの分離 pH より高く設定する必要がある）、22℃でさらに 10 分間攪拌を行った。その後、実施例 1 と同様に不溶性画分の分離沈降速度を測定するとともに、可溶性画分と不溶性画分を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動に供し、7S グロブリンと 11S グロブリンの存在比を求めた。

表 7 に可溶性画分と不溶性画分の 7S グロブリンと 11S グロブリンの存在比、表 8 に不溶性画分の分離沈降速度を示す。

°（表 7）7S グロブリンと 11S グロブリンの存在比(7S:11S)

	可溶性画分	不溶性画分
カードスラリー	93:7	9:91

（表 8）不溶性画分の分離沈降速度

カードスラリー
---------

分離沈降速度 ( $\mu\text{m}/\text{秒}$ )

156

実施例 3 および実施例 4 の結果より、大豆蛋白を含む溶液には脱脂大豆スラリーを用いた方が、不溶性画分の分離沈降が速く、分離が容易になることが明らかである。

#### <実施例 5>

実施例 1 と同様に調製した 5%カードスラリーのイオン強度を、塩化ナトリウムを用いて 0.14 に調整し、pH 調整をせずに (約 pH4.5) 22℃で 30 分間攪拌した後、50℃まで昇温した。この時、昇温に要した時間は 10 分間であった。50℃に達した後、20%水酸化ナトリウム溶液を用いて pH を 5.3 に調整し、さらに 20 分間加温処理した後、22℃まで冷却した。この時、冷却に要した時間は 5 分間であった。冷却後、5,000G で 10 分間遠心分離して可溶性画分と不溶性画分を得た。

得られた可溶性画分は、35%塩酸を用いて pH4.5 に調整し、3,000G で 10 分間遠心分離して沈澱画分を得た。次いで、沈澱画分に加水し、20%水酸化ナトリウム溶液を用いて中和した後、フリーズドライして 7S グロブリンに富んだ画分を得た。

一方、5,000G で 10 分間遠心分離して得られた不溶性画分は、5 倍重量のイオン交換水を加え、22℃でプロペラ攪拌し、20%水酸化ナトリウム溶液で pH6.8 に維持しながら 30 分間抽出した。次いで、5,000G で 10 分間遠心分離し、得られた上清画分の pH を 35%塩酸を用いて pH4.5 に調整し、3,000G で 10 分間遠心分離して沈澱画分を得た。次いで、沈澱画分に加水し、20%水酸化ナトリウム溶液を用いて中和した後、フリーズドライして 11S グロブリンに富んだ画分を得た。

得られた各画分のSDS-ポリアクリルアミド電気泳動による7S:11Sの存在比、7S グロブリンに富んだ画分の7S グロブリン純度（SPE 基準）と11S グロブリンに富んだ画分の11S グロブリン純度（SPE 基準）、クロメタ油分、7S グロブリン補正純度、11S グロブリン補正純度、および両画分のフィチン酸含量を表9に示す。また、表10に実施例1と同様に測定した不溶性画分の分離沈降速度を示す。

（表9） 各画分の組成 単位：％

	可溶性画分	不溶性画分
7S:11S	96:4	13:87
純度（SPE 基準）	93.0	82.9
粗蛋白質（乾燥重量当り）	95.7	94.2
クロメタ油分（乾燥重量当り）	0.65	1.30
補正純度	87.0	72.1
フィチン酸（乾燥重量当り）	2.1	2.0

【0038】

（表10）不溶性画分の分離沈降速度

フィターゼ処理なし	
分離沈降速度（ $\mu\text{m}/\text{秒}$ ）	182

以上の結果より、本発明方法によりクロメタ油分の少ない、即ち脂質会合蛋白質含量の少ない、高純度の 7S グロブリンおよび 11S グロブリン画分を容易に得られることが明らかである。

また、加温処理後ホールドせずに直ちに冷却した実施例 1 と、加温処理後 20 分間ホールドした実施例 5 の結果から、加温処理後にホールドすることにより分離沈降速度が向上することが分かる。

#### <実施例 6>

実施例 1 と同様に調製した 5%カードスラリーのイオン強度を、塩化ナトリウムを用いて 0.14 に調整し、pH 調整をせずに（約 pH4.5）22℃で 30 分間攪拌した後、50℃まで昇温した。この時、昇温に要した時間は 10 分間であった。50℃に達した後、20%水酸化ナトリウム溶液を用いて pH を 5.3 に調整し、対脱脂大豆 0.2 重量%のフィターゼ（新日本化学製「スミチーム PHY」）を添加してさらに 20 分間プロペラ攪拌した。その後、22℃まで冷却した。この時、冷却に要した時間は 5 分間であった。冷却後、5,000G で 10 分間遠心分離して可溶性画分と不溶性画分を得た。得られた可溶性画分は、35%塩酸を用いて pH4.5 に調整し、3,000G で 10 分間遠心分離して沈澱画分を得た。次いで、沈澱画分に加水利し、20%水酸化ナトリウム溶液を用いて中和した後、フリーズドライして 7S グロブリンに富んだ画分を得た。

一方、5,000G で 10 分間遠心分離して得られた不溶性画分は、5 倍重量のイオン交換水を加え、22℃でプロペラ攪拌し、20%水酸化ナトリウム溶液で pH6.8 に維持しながら 30 分間抽出した。次いで、5,000G で 10 分間遠心分離し、得られた上清画分の pH を 35%塩酸を用いて pH4.5 に調整し、3,000G で 10 分間遠心分離して沈澱画分を得た。次いで、沈澱画分に加水利し、20%水酸化ナトリウム溶液を用いて中和した後、フリーズドライして 11S グロブリンに富んだ画分

を得た。

得られた各画分のSDS-ポリアクリルアミド電気泳動による7S:11Sの存在比、7S グロブリンに富んだ画分の7S グロブリン純度 (SPE 基準) と11S グロブリンに富んだ画分の11S グロブリン純度 (SPE 基準)、クロメタ油分、7S グロブリン補正純度、11S グロブリン補正純度、およびフィチン酸含量を表11に示す。また、表12に実施例1と同様に測定した不溶性画分の分離沈降速度を示す。

(表11) 各画分の組成 単位：%

	可溶性画分	不溶性画分
7S:11S	97:3	14:86
純度 (SPE 基準)	94.0	81.9
粗蛋白質 (乾燥重量当り)	96.2	92.4
クロメタ油分 (乾燥重量当り)	0.61	1.24
補正純度	88.3	71.7
フィチン酸 (乾燥重量当り)	0.05	0.12

(表12) 不溶性画分の分離沈降速度

フィルター処理あり	
分離沈降速度 ( $\mu\text{m}/\text{秒}$ )	248

実施例 5 および実施例 6 の結果より、フィターゼによるフィチン酸の分解を併用することで可溶性画分と不溶性画分の分離がより一層容易になり、かつ低フィチン酸の 7S グロブリンに富んだ画分と 11S グロブリンに富んだ画分を得られることが明らかである。

#### 産業上の利用可能性

以上説明したとおり、本願発明は大豆蛋白を含む溶液のイオン強度の調整と、酸性下での加温処理を組み合わせることにより、7S グロブリンを含む可溶性画分と 11S グロブリンを含む不溶性画分を工業的に簡便に分画することができる。



## 請求の範囲

1. 大豆蛋白を含む溶液を、酸性下で加温処理の後、イオン強度 0.02 以上、pH4.5 以上 5.6 未満で可溶性画分と不溶性画分に分画することを特徴とする大豆蛋白の製造法。
2. 大豆蛋白を含む溶液が脱脂大豆の加水スラリー、同スラリーから得られる脱脂豆乳、酸沈澱大豆蛋白スラリー、または分離大豆蛋白溶液である請求項 1 記載の製造法。
3. 酸性が pH3.8~6.8 である請求項 1 記載の製造法。
4. 加温処理が 30~75℃である請求項 1 記載の製造法。
5. 請求項 1 記載の分画方法によって得られる可溶性画分から 7S グロブリン / (11S グロブリン+7S グロブリン) の比が 0.5 以上であり、固形分中のクロロホルム：メタノール=2：1 溶媒で抽出される極性脂質含量が 1 重量%以下である 7S グロブリン蛋白を分取する請求項 1 記載の製造法。
6. 固形分中のフィチン酸含量が 1.2 重量%以下である請求項 5 記載の方法で得られた 7S グロブリン蛋白。
7. 請求項 1 記載の分画方法によって得られる不溶性画分から 11S グロブリン / (11S グロブリン+7S グロブリン) の比が 0.7 以上であり、固形分中のクロロホルム：メタノール=2：1 溶媒で抽出される極性脂質含量が 2 重量%以下である 11S グロブリン蛋白を分取する請求項 1 記載の製造法。
8. 固形分中のフィチン酸含量が 1.2 重量%以下である請求項 7 記載の方法で得られた 11S グロブリン蛋白。

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP03/13585

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
Int.Cl<sup>7</sup> A23J3/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> A23J3/16, C07K14/415

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CA (STN)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 02/28198 A1 (Fuji Oil Co., Ltd.), 11 April, 2002 (11.04.02), Full text; particularly, Claims & EP 1323353 A1 & AU 9229101 A	5, 6, 8 1-4, 7
X	JP 2002-114694 A (Fuji Oil Co., Ltd.), 16 April, 2002 (16.04.02), Full text; particularly, Claims 1 to 3 (Family: none)	8
Y	US 4370267 A (STALEY MFG. CO. A.E.), 25 January, 1983 (25.01.83), Full text; particularly, Claims & EP 72094 A & DK 8203557 A & BR 8204675 A & ES 8306572 A & CA 1181705 A & JP 58-36345 A	1-4, 7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 16 February, 2004 (16.02.04)	Date of mailing of the international search report 02 March, 2004 (02.03.04)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13585

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 5-43597 A (Fuji Oil Co., Ltd.), 23 February, 1993 (23.02.93), Full text; particularly, Claims (Family: none)	1-4, 7
Y	JP 55-124457 A (Noda Institute for Scientific Research), 25 September, 1980 (25.09.80), Full text; particularly, Claims (Family: none)	1-4, 7

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>1</sup> A23J 3/16

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>1</sup> A23J 3/16, C07K 14/415

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	WO 02/28198 A1 (不二製油株式会社) 2002.04.11 全文、特に、 クレーム & EP 1323353 A1 & AU 9229101 A	5, 6, 8 1-4, 7
X	JP 2002-114694 A (不二製油株式会社) 2002.04.16 全文、特に、 クレーム1-3 (ファミリーなし)	8
Y	US 4370267 A (STALEY MFG CO A E) 1983.01.25 全文、 特に、クレーム & EP 72094 A & DK 8203557 A & BR 8204675 A & ES 8306572 A & CA 1181705 A & JP 58-36345 A	1-4, 7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16.02.2004

国際調査報告の発送日

02.3.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田 淳子

4N

8115

電話番号 03-3581-1101 内線 3403

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 5-43597 A (不二製油株式会社) 1993. 02. 23 全文、特に、クレーム (ファミリーなし)	1-4, 7
Y	JP 55-124457 A (財団法人野田産業科学研究所) 1980. 09. 25 全文、特に、クレーム (ファミリーなし)	1-4, 7